

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

(11) N° de publication : **2 805 466**
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)
(21) N° d'enregistrement national : **00 02390**
(51) Int Cl⁷ : A 61 K 39/002, A 61 P 33/02, G 01 N 33/569

(12)

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

(22) Date de dépôt : 25.02.00.

(30) Priorité :

(71) Demandeur(s) : VIRSOL Société en nom collectif —
FR.

(43) Date de mise à la disposition du public de la
demande : 31.08.01 Bulletin 01/35.

(56) Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : Se reporter à la fin du
présent fascicule

(60) Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

(72) Inventeur(s) : LEBRUN MARYSE et BOUT DANIEL.

(73) Titulaire(s) :

(74) Mandataire(s) : CABINET BEAU DE LOMENIE.

(54) UTILISATION DE LA PROTEINE MIC3 DE TOXOPLASMA GONDII OU D'UN DE SES DERIVES EN TANT
QU'AGENT IMMUNOGENE OU EN TANT QU'ANTIGENE DE VACCINATION.

(57) L'invention concerne l'utilisation de la protéine MIC3
de Toxoplasma gondii ou d'un de ses dérivés en tant
qu'agent immunogène ou en tant qu'antigène de vaccina-
tion.

FR 2 805 466 - A1



L'invention concerne l'utilisation de la protéine MIC3 de *Toxoplasma gondii* ou d'un de ses dérivés en tant qu'agent immunogène ou en tant qu'antigène de vaccination.

L'invention concerne également un vaccin anti-toxoplasmose contenant 5 ladite protéine ou un de ses dérivés, ainsi que l'utilisation de la protéine MIC3 ou d'un de ses dérivés pour la détection d'anticorps spécifiques de *Toxoplasma gondii* et/ou de ses fragments dans un échantillon susceptible de les contenir.

Par « agent immunogène », on entend une molécule capable de susciter une réponse immunitaire humorale et/ou cellulaire.

10 Par « protéine MIC3 de *Toxoplasma gondii* ou un de ses dérivés », on entend la protéine MIC3 native isolée de *Toxoplasma gondii* ainsi que la protéine MIC3 obtenue par recombinaison dans un système procaryote ou eucaryote et/ou éventuellement associée au cours de la recombinaison, de manière covalente ou non covalente, à une protéine porteuse n'induisant pas ou peu de réponse immunitaire ou 15 une réponse immunitaire très inférieure à celle résultant de la protéine MIC3.

La protéine MIC3 native peut, par exemple, être isolée par immunopurification comme décrit dans A. Achbarou *et al.*, Mol. Biochem. Parasitol., 1991, 47, 223-234.

20 *Toxoplasma gondii* est un parasite protozoaire responsable de la toxoplasmose humaine et animale. Cette infection revêt un caractère de grande sévérité, lorsqu'elle atteint le foetus lors d'une primo-infection et chez les sujets immunodéprimés, en particulier les malades atteints du SIDA.

25 *Toxoplasma gondii* est un parasite intracellulaire obligatoire, capable d'entrer activement et de se multiplier dans toutes les cellules nucléées. Sous forme extracellulaire, le parasite ne se multiplie pas, et se montre sensible à l'action du système immunitaire. En revanche, sous forme intracellulaire, il se divise activement et échappe au système immunitaire.

30 L'attachement puis l'invasion du parasite dans les cellules hôtes sont des étapes clefs dans le développement de l'infection. C'est pourquoi il est d'un grand intérêt de déterminer les molécules parasitaires impliquées dans les processus d'attachement et d'invasion en vue de les utiliser comme des antigènes de vaccination.

La protéine MIC3 est une protéine parasitaire impliquée dans l'attachement de *Toxoplasma gondii* aux cellules hôtes. Cette protéine est présente sur tous les stades infectieux du parasite et est localisée au niveau des micronèmes de *Toxoplasma gondii* (A. Achbarou *et al.*, Op. cit.). Les micronèmes sont des organites intracellulaires impliqués dans le processus d'invasion du toxoplasme (Dubremetz *et al.*, 1998). MIC3 est un dimère de poids moléculaire apparent de 90 kDa formé de deux sous-unités de 38 kDa reliées par des ponts disulfures (Achbarou *et al.*, Op. cit.).

On a maintenant trouvé que la protéine MIC3 de *Toxoplasma gondii*, suscitait une précoce et très forte réponse immunitaire humorale au cours d'une infection à *Toxoplasma gondii*. Cette réponse immunitaire est comparable à celle obtenue avec l'antigène SAG1, protéine majeure du toxoplasme et fortement immunogène. En outre, on a trouvé que des IgG anti-MIC3 sont présentes dans les sérum d'individus séropositifs pour la toxoplasmose, indiquant une immunogénicité de MIC3 chez l'homme également.

L'utilisation de la protéine MIC3 selon les différents aspects de l'invention est particulièrement avantageuse dans la mesure où la protéine MIC3 est présente sur tous les stades infectieux du parasite alors que d'autres protéines, comme SAG1, ne sont présentes que sur le stade tachyzoïte. En effet, la protéine MIC3 est sécrétée au moment de l'invasion et vient alors recouvrir la surface parasitaire. Elle est de ce fait exposée au système immunitaire sans qu'il y ait besoin de lyse parasitaire, et peut donc être reconnue par le système immunitaire de l'organisme hôte à un stade précoce de la toxoplasmose.

L'invention a donc pour objet l'utilisation de la protéine MIC3 ou d'un de ses dérivés en tant qu'agent immunogène.

Ladite protéine ou ses dérivés peut (peuvent) notamment être utilisé(s) pour la production d'anticorps, notamment par injection à des mammifères et récupération de sérum de ces mammifères contenant les anticorps spécifiques.

L'invention concerne selon un second aspect l'utilisation de la protéine MIC3 ou d'un de ses dérivés comme antigène de vaccination, ainsi qu'un vaccin anti-toxoplasmose contenant la protéine MIC3 ou un de ses dérivés.

Ledit vaccin pourra être administré par voie orale, intradermique, sous-cutanée, intramusculaire, sub-linguale, ou, de manière préférée, par voie intranasale, et comprendre un ou plusieurs adjuvants.

5 Selon un aspect ultérieur, l'invention concerne également l'utilisation de la protéine MIC3 de *T. gondii* pour la détection de *T. gondii* dans un échantillon susceptible de le contenir.

Plus particulièrement, l'invention concerne un procédé de détection 10 d'anticorps spécifiques de *T. gondii* et/ou de ses fragments dans un échantillon, susceptible de les contenir, caractérisé en ce qu'on ajoute à cet échantillon la protéine 15 MIC3 de *Toxoplasma gondii* ou un de ses dérivés et qu'on détecte la formation d'un complexe antigène-anticorps.

Cette détection est effectuée à l'extérieur du corps humain ou animal.

De manière générale, la protéine MIC3 ou un de ses dérivés sera mise en contact avec un échantillon de liquide biologique, notamment sérum, plasma, urine, 15 liquide céphalo-rachidien ou tout autre liquide biologique susceptible d'être soumis à analyse tel que les larmes, les produits de lavage trachéoalvéolaires, la synovie ou la salive, contenant éventuellement lesdits anticorps, de manière à former un complexe antigène-anticorps qui est ensuite détecté par un procédé de détection classique, par exemple en utilisant un procédé de traçage radiologique, comme par exemple dans 20 les techniques RIA (Radio Immuno Assays), par marquage enzymatique, comme notamment dans les techniques ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assays), ou encore par l'agglutination de particules sensibilisées, un procédé à la bentonite, un procédé d'électrophorèse (immunotransfert) ou tout autre procédé connu de l'homme 25 du métier.

25 L'invention est illustrée par les exemples ci-dessous.

Exemple1 Construction de la protéine MIC3 recombinante

La protéine recombinante MIC3 a été construite en fusion à la protéine MBP « maltose binding protéine » comme décrit ci-dessous. La protéine MIC3 produite tient compte de la modification post-traductionnelle que subit MIC3 chez le parasite. 30 La fusion de MIC3 à la MBP commence à l'acide aminé 67 jusqu'au dernier acide aminé de MIC3.

1/ Clonage du gène Mic3 en fusion au gène de la MBP : MBP-MIC3

Pour cloner le gène Mic3 en fusion avec le gène de la protéine MBP, on a utilisé le vecteur de clonage pMALp2x (New England Biolaps). Ce vecteur contient le gène de la MBP suivi d'un polylinker permettant d'introduire le gène MIC3 en phase de lecture avec la MBP. Le plasmide résultant est ensuite introduit dans une souche *d'Escherichia coli* TB1 (New England Biolaps). Le clone, obtenu (pMALp2x-7), est conservé pour la production de la protéine recombinante.

1.1/ Ligation

Le vecteur de clonage pMALp2x (New England Biolaps) a été digéré par les enzymes de restriction *XbaI* et *HindIII* du polylinker. Le produit de digestion a été purifié à l'aide du kit geneclean (Bio101). Parallèlement, le gène MIC3 a été amplifié par PCR à l'aide des amorces oligonucléotidiques ML1 (GCTCTAGATCCCCAGCAAGCAGCAGA) et ML4 (ATTAAGCTTCACTGCTTAATTTCTCACACGTCAC) comportant respectivement à leur extrémité les sites de restriction *XbaI* ET *HindIII*. ML1 correspond à l'extrémité nucléotidique N-terminale de Mic3 et ML4 à l'extrémité nucléotidique C-terminale de Mic3. Le fragment de PCR obtenu (899pb) a été purifié à l'aide du kit geneclean et digéré par les enzymes *XbaI* et *HindIII*. Ce produit de digestion a de nouveau été purifié à l'aide du kit geneclean.

L'insertion du fragment de PCR-*XbaI-HindIII* dans le vecteur pMLAp2x-*XbaI-HindIII* a été réalisée en présence de T4 DNA ligase (Gibco BRL).

1.2/ Transformation

Des bactéries compétentes *E. coli* TB1 ont été transformées par le produit de ligation. Trente clones bactériens résistants à l'ampicilline ont été analysés.

25 1.3/ Analyse des clones transformés « miniprep plasmides »

A l'issu de la transformation, l'ADN plasmidique a été extrait de 30 clones bactériens, puis digéré par *XbaI* et *HindIII*, afin de vérifier la taille de l'insert. Un clone contenant l'insert de 899 pb a été retenu : pMALp2x-7.

2/ Purification de MBP-MIC3

La protéine MBP-MIC3 est purifiée à partir d'*Escherichia coli* exprimant la protéine MBP-MIC3. La protéine MBP ayant une forte affinité pour le maltose, la protéine recombinante MBP-MIC3 est ensuite purifiée sur une colonne d'amylose.

5 2.1/ Induction de l'expression de MBP-MIC3

500 ml de milieu LB additionné de glucose (0,2 %) et d'ampicilline (100 µg/ml) sont ensemencés au 1/100 à partir d'une culture de la veille du clone d'*Escherichia coli* TB1 portant le plasmide pMALp2x-7. Pour une densité optique de 0,5 à 600 nm, l'expression de la protéine recombinante est réalisée en présence de 10 0,3 mM d'IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside) (appligene) durant 3 heures à 37°C sous agitation.

10 2.2/ Production d'un lysat bactérien

Les bactéries sont centrifugées à 4000 g durant 20 min à 4°C. Le surnageant est éliminé, le culot bactérien est pesé puis repris dans un tampon « colonne » (Tris .Cl 20 mM pH 7,4 ; NaCl 200 mM ; EDTA 1 mM) à raison de 10 ml par g de bactéries. La culture est congelée pour fragiliser les membranes bactériennes. Après décongélation, les bactéries sont soumises à une sonication 6 fois pendant 4 min à une puissance de 9 V avec un sonicateur Vibra-cell (Bioblock). Les bactéries sont centrifugées à 4°C durant une heure à 9800 g. Le surnageant contenant la protéine recombinante est conservé à - 20°C.

15 2.3/ Purification sur colonne d'amylose de MBP-MIC3

La résine d'amylose utilisée est commercialisée par Biolabs. La purification est réalisée à 4°C avec des solutions préalablement refroidies à 4°C.

20 Régénération de la résine d'amylose :

25 3 ml de résine sont coulés dans une colonne de 2,5 cm de diamètre, puis régénérée par une succession de lavages :

- 3 ml d'eau
- 9 ml de SDS 0,1 % préalablement incubé à température ambiante
- 9 ml d'eau
- 24 ml de tampon « colonne »

30

Chargement de la colonne et lavage de la colonne

Le lysat bactérien est chargé sur la colonne avec un débit d'environ 0,5 ml par minute. La colonne est ensuite lavée avec 24 ml de tampon « colonne ».

Elution de MBP-MIC3

5 L'élution est réalisée par compétition pour le maltose avec 5 ml du tampon « colonne » contenant 10 mM de maltose. Dix fractions d'élution de 0,5 ml sont récupérées. La colonne est ensuite lavée par 25 ml de tampon « colonne » et régénérée comme décrit ci-dessus en vue d'une autre utilisation. La résine peut être réutilisée au moins trois fois.

10 3/ Analyse et dosage de MBP-MIC3

La quantité de protéines contenue dans chaque fraction est dosée au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 280 nm. Les différentes fractions sont analysées soit (1) après migration en gel de polyacrylamide et coloration au bleu de Coomassie en présence ou absence d'agent réducteur (β -mercaptoéthanol) ou (2) par 15 un test d'imuno-empreinte (« immunoblot ») avec des anticorps polyclonaux anti-MBP ou anti-MIC3.

20 Les fractions les plus riches sont concentrées par ultrafiltration à 3000 rpm (4°C) à l'aide d'unité de filtration coupant à 10 kDa (Centricon 10, Millipore). La quantité de protéine contenue dans les purifications concentrées est ensuite dosée plus précisément à l'aide du kit « BCA » (Pierce).

4/ Caractéristiques de MBP-MIC3

La purification de la protéine MBP-MIC3 donne des rendements de purification de l'ordre de 2,5 mg de protéines par g de bactéries. L'analyse en gel de polyacrylamide des purifications montre que les préparations sont très pures, c'est-à- 25 dire exemptes de la protéine d'origine bactérienne autres que la MBP-MIC3 mais une forte aggrégation de la protéine recombinante est observée lors de l'étape de purification sur colonne d'amylose. La protéine recombinante MBP-MIC3 est présente sous forme monomérique de manière prépondérante mais existe aussi sous forme dimérique en quantité moindre. Le poids moléculaire apparent de la forme 30 monomérique est d'environ 70 kDa.

La protéine MBP-MIC3 est reconnue par les différentes sources d'anticorps anti-MIC3 disponibles au laboratoire, par exemple l'hybridome T4.2F3.2F5 (A. Achbarou et al., Mol. Biochem. Parasitol., 1991, 47, 223) ou les anticorps provenant du sérum de souris CBA/J infectées avec des kystes de toxoplasme 76 K (T. Charles et al., Infect. Immunol., 1990, 58, 1240). Ces anticorps étant de type conformationnel, ce résultat indique que la protéine MBP-MIC3 adopte une conformation proche de celle existant chez le toxoplasme.

5 **Exemple 2 Etude de l'immunogénicité de MBP-MIC3 après immunisation par voie nasale**

10 Trois souris C57 et trois souris CBA/J ont été éthérées puis immunisées par voie nasale avec 10 µg de protéine MBP-MIC3 obtenue selon l'exemple 1 (lot ML1038) en association avec 0,5 µg de toxine cholérique. Une immunisation rappel a été effectuée 28 jours après la première immunisation. La réponse immunitaire humorale anti-MIC3 a été évaluée en dosant les anticorps sériques anti-MIC3 et la 15 réponse immunitaire cellulaire a été évaluée par un test de prolifération lymphoblastique 46 jours après la première immunisation. Les réponses immunitaires humorales et cellulaires ont été déterminées vis-à-vis de la protéine recombinante MBP-MIC3, de la protéine porteuse MBP et de la protéine MIC3 native du toxoplasme (à partir d'extrait parasitaire).

20 **1/ Etude de la réponse humorale**

La présence d'IgG anti-MIC3 dans les sérum préimmuns ainsi que dans les sérum provenant des prélèvements sanguins effectués à J27 et à J46 a été évaluée par Western Blot et ELISA vis-à-vis d'un extrait parasitaire contenant MIC3.

25 **1.1/ Préparation de l'extrait parasitaire**

Des souris femelles de souches Swiss OF1 âgées de 6 à 7 semaines sont inoculées par voie intrapéritonéale avec un mélange contenant 10^7 tachyzoïtes de *T. gondii*, souche RH (A.B. Sabin, J. Am. Med. Assoc., 1041, 116, 801-807) et 12×10^6 cellules sarcomateuses de TG180 (P. Couzineau et al., Annales de Parasitologie humaine et comparée, 1969, 44, 217-222) sous un volume total de 10 ml de milieu essentiel minimum (MEM) (Sigma). 4 à 5 jours plus tard, les souris sont sacrifiées par dislocation cervicale et l'ascite est ponctionnée par lavage de la cavité

intrapéritonéale avec 5 ml de milieu MEM. La suspension parasitaire subit une première centrifugation à 1600 g pendant 10 minutes à 4°C. Le culot est lavé trois fois par 5xN ml de milieu MEM (N est le nombre de souris). Une centrifugation à 1600 g pendant 10 min à 4°C est resuspendu dans de l'eau milliQ à la concentration 5 de 500 millions par ml. La suspension parasitaire est soumise à une sonication dans de la glace à raison de 12 cycles de 30 s espacés d'1 min. Le lysat obtenu subit une centrifugation à 2000 g pendant 5 min afin de se débarrasser des parasites et débris cellulaires. Le surnageant correspond à l'extrait total parasitaire.

1.2/ Western Blot

10 130 µg d'extrait parasitaire et le marqueur de poids moléculaire (Gibco BRL) sont déposés sur un gel d'acrylamide à 10 %. Après une heure de migration à 200 V, le matériel protéique est électrotransféré sur une membrane de nitrocellulose (Slcheicher and Schull) durant 1 h 30 à 48 mA. La membrane est saturée durant 1 h à température ambiante en TNT 1X (Tri-HCl 15 mM ; NaCl 140 mM ; Tween 15 0,05 %, pH = 8) additionné de 5 % de lait écrémé puis incubée 1 h à température ambiante en présence des sérum de souris immunisées dilués au 1/25 en TNT-lait 5 %. Après trois lavages en TNT de 5 min, la membrane de nitrocellulose est incubée en présence d'un conjugué de chèvre anti-IgG de souris marqué à la phosphatase alcaline (Sigma) dilué au 1/1000 en TNT-lait 5 %. Après une heure d'incubation à 20 température ambiante, la membrane est lavée : un lavage de 20 min en TNT, deux lavages de 5 min en TNT, un lavage de 5 min en tampon R (Tris-HCl 100 mM, NaCl 100 mM, MgCl₂,6H₂O 5 mM, pH = 9,5). La révélation est effectuée à l'obscurité en présence de nitro blue tetrazolium et de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate (NBT-BCIP, Sigma). La réaction est stoppée avec l'eau distillée.

25 1.3/ Test ELISA

Les plaques de 96 puits à fond plat (Nunc) sont revêtues de l'extrait parasitaire à raison de 100 µl par puits avec une solution à 100 µg/ml d'extrait parasitaire obtenu comme décrit au point 1.1 ci-dessus dilué en tampon carbonate 30 50 mM, pH 9,6. Après une nuit d'incubation à 4°C, les plaques sont lavées 3 fois en PBS-Tween 20 0,05 % (V/V) puis sont saturées 1 h à 37°C avec 200 µl/puits de PBS-BSA 1 %, sont ajoutées à raison de 100 µl/puits dans les plaques saturées.

Après 2 h d'incubation à 37°C, les plaques sont lavées 3 fois en PBS-Tween 20 0,05 %. Les conjugués marqués à la phosphatase alcaline anti-IgG de souris préparés chez la chèvre (Sigma), dilués au 1/1000^{ème} en PBS-BSA 1 %, sont distribués à raison de 100 µl par puits. Les plaques sont alors incubées 1 h à 37°C, puis lavées 3 fois en 5 PBS-Tween 20 0,05 %. Le paranitrophénol-phosphate disodique (Sigma) à 1 mg/ml en tampon diéthanolamine 1 M, pH 9,8 est réparti à raison de 100 µl/puits. Le développement de la réaction enzymatique s'effectue à 37°C durant 20 min pour les IgG sériques. L'absorbance à 405 nm est mesurée à l'aide d'un lecteur ELISA automatique (Multiskan MCC 340, Flow Laboratories, Inc.).

10 2/ Etude de la réponse cellulaire

La réponse immunitaire cellulaire a été évaluée par un test de prolifération lymphoblastique à J46 sur les rates et les ganglions mésentériques.

Test de transformation lymphoblastique

Les ganglions mésentériques et les rates sont prélevés stérilement et déposés 15 dans 5 ml d'une solution saline tamponnée de Hanks (HBSS), Hépès 25 mM (HBSS-Hépès). Les organes sont ensuite placés sur un morceau de voile nylon (Blutex nylon monofilament, Tripette et Renaud, France) dans une boîte de Pétri contenant 3-4 ml de milieu HBSS-Hépès et sont écrasés à l'aide d'un piston de seringue stérile. Le broyat est alors filtré au-dessus d'un tube Falcon à l'aide d'un 20 morceau de Blutex. La boîte de Pétri et le filtre sont abondamment rincés avec du milieu HBSS-Hépès. La suspension cellulaire est ensuite centrifugée à 400 g pendant 10 min à 20°C. Les érythrocytes présents dans le broyat des cellules spléniques sont ensuite lysés par un choc hypotonique dans 25 ml de tampon NH₄Cl 139,5 mM, Tris-HCl 17 mM, pH 7,4 pendant 3 min sous agitation, pour éviter les agrégats 25 cellulaires puis le volume est ajusté à 50 ml avec du milieu HBSS-Hépès. Les cellules sont centrifugées à 400 g pendant 10 min à 20°C puis mises en suspension dans 3 à 5 ml de milieu de culture (RPMI 1640 GIBCO, France ; Hépès 25 mM ; SVF 5 % GIBCO ; glutamine 2 mM ; pyruvate de sodium 1 mM ; µ-mercaptopéthanol 5 x 10⁻⁵ M ; gentamycine 50 µg/ml ; pénicilline 100 U/ml ; streptomycine 100 µg/ml). 30 Les cellules sont alors dénombrées sur une cellule de Malassez et sont réparties dans

des plaques de culture cellulaire à 96 puits à fond plat (Costar), à raison de 100 μ l d'une suspension cellulaire à 5×10^6 cellules par ml pour les splénocytes et $3,5 \times 10^6$ cellules par ml pour les cellules, des ganglions mésentériques. Les puits sont préalablement sensibilisés avec l'antigène à tester (extrait toxoplasme = ET) ; en dilution séries de raison 2 (ET : 10 μ g/ml à 1 ,25 μ g/ml). Les témoins positif et négatif de lymphoprolifération sont constitués respectivement d'une lectine à activité mitogène : la concanavaline A (10 μ g/ml) et d'un antigène standard (BSA à 10 μ g/ml). Les plaques sont incubées à 37°C sous 5 % de CO₂ et 95 % d'humidité pendant 5 jours. Une microcurie de thymidine tritiée (Dupont de Nemours, USA) est ajoutée dans chaque puits. Dix huit heures après le marquage radioactif, les plaques sont congelées à - 20°C. La décongélation permet de faire éclater les cellules dont le noyau est récupéré sur des pastilles de fibre de verre à l'aide d'un Skatron (Norvège). La radioactivité incorporée dans l'ADN des cellules en division est mesurée en coups par minute (cpm) à l'aide d'un compteur Béta (Packard, USA).

15 3/ Résultats

3.1/ Immunogénicité de MBP-MIC3 chez la souris C57 sensibles à la phase aigüe de l'infection

- Réponse humorale

Les résultats obtenus sur le prélèvement de sang effectué à J27 montrent que, dès la première immunisation, des IgG spécifiques de la protéine MIC3 du toxoplasme sont détectables dans les sérums. Après la seconde immunisation, la quantité d'IgG anti-MIC3 est augmentée.

- Réponse cellulaire

Aucune lymphoprolifération n'est observée dans les ganglions mésentériques après restimulation par l'extrait parasitaire.

Dans la rate, une prolifération significative des lymphocytes T est observée après restimulation par l'extrait parasitaire.

3.2/ Immunogénicité de MBP-MIC3 chez la souris CBA/J sensibles à la phase chronique de l'infection

30 - Réponse humorale

Des IgG spécifiques de la protéine du toxoplasme sont détectables dès la première immunisation.

- Réponse cellulaire

Dans la rate, une légère prolifération des lymphocytes T est observée après 5 restimulation par l'extrait total.

Aucune prolifération n'est observée dans les ganglions mésentériques des souris CBA/J.

3.3/ Conclusions

L'immunisation nasale avec la protéine recombinante MBP-MIC3 en 10 association à la toxine cholérique induit une réponse humorale vis-à-vis de la protéine MIC3 de toxoplasme à la fois chez les souris C57 et les souris CBA/J. Cette réponse IgG anti-MIC3 apparaît dès la première immunisation chez les C57 et y est particulièrement forte.

L'immunisation nasale avec la protéine recombinante MBP-MIC3 en 15 association à la toxine cholérique induit une réponse cellulaire vis-à-vis de la protéine MIC3 de toxoplasme dans la rate à la fois chez les souris C57 et les souris CBA/J. Cette réponse cellulaire conforte l'intérêt de l'utilisation de la protéine MIC3 comme antigène à potentiel vaccinant dans la mesure où il est établi que l'immunité à médiation cellulaire est une composante importante de la protection immune vis-à- 20 vis du toxoplasme.

REVENDICATIONS

1. Utilisation de la protéine MIC3 de *Toxoplasma gondii* ou d'un de ses dérivés en tant qu'agent immunogène.
- 5 2. Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que la protéine MIC3 ou un de ses dérivés est utilisée en tant qu'antigène vaccinal pour la préparation d'un vaccin anti-toxoplasmose.
3. Utilisation selon les revendications 1 ou 2, caractérisée en ce que la protéine MIC3 est native.
- 10 4. Utilisation selon les revendications 1 ou 2, caractérisée en ce que la protéine MIC3 est obtenue par recombinaison.
5. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que la protéine MIC3 est associée, par liaison covalente ou non covalente, à une protéine porteuse.
- 15 6. Vaccin anti-toxoplasmose contenant en tant qu'antigène vaccinal la protéine MIC3 ou un de ses dérivés.
7. Vaccin selon la revendication 6, caractérisé en ce que la protéine MIC3 est native.
- 20 8. Vaccin selon la revendication 6, caractérisé en ce que la protéine MIC3 est obtenue par recombinaison.
9. Vaccin selon l'une quelconque des revendications 6 à 8, caractérisé en ce que la protéine MIC3 est associée, par liaison covalente ou non covalente, à une protéine porteuse.
- 25 10. Vaccin selon l'une quelconque des revendications 6 à 9, caractérisé en ce qu'il comprend également un ou plusieurs adjuvants.
11. Vaccin selon l'une quelconque des revendications 6 à 10, caractérisé en ce qu'il est formulé pour une administration par voie intranasale, orale, intradermique, sous-cutanée, intramusculaire ou sub-linguale.
- 30 12. Procédé de détection d'anticorps spécifiques de *Toxoplasma gondii* et/ou de ses fragments dans un échantillon susceptible de les contenir, caractérisé en ce

qu'on ajoute à cet échantillon la protéine MIC3 de *Toxoplasma gondii* ou un de ses dérivés et qu'on détecte la formation d'un complexe antigène-anticorps.

13. Procédé selon la revendication 12, caractérisé en ce que l'échantillon est un échantillon de liquide biologique.

5 14. Procédé selon l'une des revendications 12 ou 13, caractérisé en ce que la protéine MIC3 est native.

15. Procédé selon l'une des revendications 12 ou 13, caractérisé en ce que la protéine MIC3 est obtenue par recombinaison.

16. Procédé selon l'une des revendications 12 à 15, caractérisé en ce que la 10 protéine MIC3 est associée, par liaison covalente ou non covalente, à une protéine porteuse.

RAPPORT DE RECHERCHE
PRÉLIMINAIRE

 établi sur la base des dernières revendications
 déposées avant le commencement de la recherche

2805466

N° d'enregistrement
nationalFA 587852
FR 0002390

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
T	GARCIA-REGUET N ET AL: "The microneme protein MIC3 of <i>Toxoplasma gondii</i> is a secretory adhesin that binds to both the surface of the host cells and the surface of the parasite" <i>CELLULAR MICROBIOLOGY</i> , vol. 2, no. 4, août 2000 (2000-08), pages 353-364, XP000960353 ---		A61K39/002 A61P33/02 G01N33/569
A	WO 99 61906 A (ABBOTT LAB) 2 décembre 1999 (1999-12-02) ---		
A,D	ACHBAROU A ET AL: "Characterisation of microneme proteins of <i>Toxoplasma gondii</i> " <i>MOLECULAR AND BIOCHEMICAL PARASITOLOGY</i> , vol. 47, no. 2, 1991, pages 223-234, XP000960323 ---		
A,D	CHANNON J ET AL: "Attachment ligands of viable <i>Toxoplasma gondii</i> induce soluble immunosuppressive factors in human monocytes." <i>INFECTION AND IMMUNITY</i> , vol. 67, no. 5, mai 1999 (1999-05), pages 2547-2551, XP002152132 ---		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.Cl.7)
A	DUBREMETZ J-F: "Host cell invasion by <i>Toxoplasma gondii</i> ." <i>TRENDS IN MICROBIOLOGY</i> , vol. 6, no. 1, janvier 1998 (1998-01), pages 27-30, XP000960333 --- ---		A61K C07K G01N
		-/-	
1	Date d'achèvement de la recherche	Examinateur	
	7 novembre 2000	Teyssier, B	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	
EPO FORM 1503 12/99 (PA/C14)			

**RAPPORT DE RECHERCHE
PRÉLIMINAIRE**

 établi sur la base des dernières revendications
 déposées avant le commencement de la recherche

2805466

N° d'enregistrement
nationalFA 587852
FR 0002390

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
A, D	DUBREMETZ J-F ET AL: "Apical organelles and host-cell invasion by Apicomplexa" INTERNATIONAL JOURNAL FOR PARASITOLOGY, vol. 28, no. 7, juillet 1998 (1998-07), pages 1007-1013, XP000960321		
L	Citation tronquée dans la demande (page 2) -----		
DOMAINE TECHNIQUE RECHERCHÉS (Int.Cl.7)			
1			
Date d'achèvement de la recherche		Examinateur	
7 novembre 2000		Teyssier, B	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire			